

①

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES PATENTAMT



Int. Cl.:

A 61 i

A 61 k

A 23 b

3)

②

Deutsche Kl.:

30 i, 1

30 h, 2/30

53 c, 3/03

⑩

⑪

⑫

⑬

⑭

# Offenlegungsschrift 1814 084

Aktenzeichen: P 18 14 084.6

Anmeldetag: 11. Dezember 1968

Offenlegungstag: 25. Juni 1970

Ausstellungspriorität: —

⑮

Unionspriorität

⑯

Datum:

⑰

Land:

⑱

Aktenzeichen:

①

Bezeichnung:

Verfahren zum Abtöten und/oder Inaktivieren und/oder Attenuieren von Mikroorganismen

②

Zusatz zu:

③

Ausscheidung aus:

④

Anmelder:

Bach, Dr. Jean, Basel (Schweiz)

Vertreter:

Berg, Dr.; Stapf, Dipl.-Ing.; Patentanwälte, 8060 München

⑤

Als Erfinder benannt:

Erfinder ist der Anmelder

Benachrichtigung gemäß Art. 7 § 1 Abs. 2 Nr. 1 d. Ges. v. 4. 9. 1967 (BGBl. I S. 960): —

1814084

DR. BERG DIPL.-ING. STAFF  
PATENTANWÄLTE  
8 MÜNCHEN 2, HILDESTRASSE 20

1814084

Dr. Berg Dipl.-Ing. Staff, 8 München 2, Hildestrasse 20

Unser Zeichen

Datum

VII/Gd 17 767

11. Dez. 1968

Anwaltsakten-Nr. 17 767

Jean Bach, B a s e l / Schweiz.

---

"Verfahren zum Abtöten und/oder Inaktivieren und/oder  
Attenuieren von Mikroorganismen."

---

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Abtöten und/oder Inaktivieren und/oder Attenuieren von Mikroorganismen in Substanzen oder Produkten, deren mittlere Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) und/oder dielektrischer Verlustfaktor ( $\tan \delta$ ) von denen der abzutötenden oder zu schädigenden Mikroorganismen abweicht, mittels elektrischer, vorzugsweise mit elektrischer Hochfrequenzbestrahlung.

009826/1981

BAD ORIGINAL

Das Verfahren gemäss Erfindung ist ferner auf die Verschiedenheit der Wärmeleitfähigkeit der Produkte einerseits und der Mikroorganismen, oder von Teilen derselben andererseits zur Abtötung bzw. Schädigung der Mikroorganismen gerichtet.

Schliesslich nutzt das Verfahren auch die Einwirkung des elektromagnetischen Wechselfeldes als solchen insbesondere zur Schädigung der in den Mikroorganismen enthaltenen Nukleinsäuren.

Mit Mikroorganismen sollen hier alle Erreger, wie z.B. Viren, Bakterien, Mycoplasmen, Rickettsien, Bacillen und deren Sporen, sowie deren Produkte, wie z.B. Toxine etc. gemeint sein.

Das Verfahren eignet sich auch zur Zerstörung von Enzymen, die in den Produkten enthalten sein können.

Wenn auch dem Grunde nach die Zahl der Produkte, die durch das erfindungsgemässe Verfahren beispielsweise sterilisiert werden können, nicht begrenzt ist, so lässt sich die Erreichung in erster Linie nicht nur zum Sterilisieren von Produkten, sondern auch zum Abtöten und/oder Inaktivieren, bzw. Abkürzen (= teilweise Inaktivierung) von Kolonien von Kulturen von Mikroorganismen verwerten, was dies z.B. zur Gewinnung von Impfstoffen erforderlich ist.

Das der Erfindung entsprechende Verfahren kann auch Anwendung finden, um Erreger lebens- bzw. fortpflanzungsunfähig zu machen oder sie diesbezüglich zu schädigen, ohne die in ihnen enthaltenen oder die von ihnen bereits ausgeschiedenen Wirkstoffe (Eiweisse) zu zerstören. Dies wird insbesondere dann möglich sein, wenn die dielektrischen bzw. Wärmeleiteigenschaften dieser Substanzen sich von denjenigen der Erreger selbst im Sinne des Verfahrens günstig unterscheiden.

Eine weitere Wirkungsweise des Verfahrens beruht darauf, dass die Riesenmoleküle der zu vernichtenden oder zu schädigenden Nukleinsäuren (DNS und RNS) ausser von der Wärme auch von elektromagnetischen und infolge der Letzteren auftretenden mechanischen Bedingungen im Sinne des Verfahrens beeinflusst werden.

Diese Riesenmoleküle stellen nicht nur elektrisch beeinflussbare Körper dar, sie weisen an manchen Stellen ihrer meist schraubenlinienförmig verlaufenden "Ketten" zwischen ihren Amino-Säure "Bausteinen" Bindungen auf, die keine chemischen Valenzen, sondern nur Van der Waals'sche Anziehungskräfte darstellen, die elektrostatischer Natur sind. Vor allem an diesen Stellen werden naturgemäss die elektromagnetischen Einflüsse des Kraftfeldes und die von diesen letzteren hervorgerufene kinetische Wirkung wirksam, welche letztere schon darum beachtlich ist, weil sich Eiweissmoleküle unter gewissen Voraussetzungen wie Dipole verhalten

und bestrebt sind, sich im Magnetfeld auszurichten. Dies wirkt im Sinne der durch die Erfindung angestrebten Wirkung günstig, da ja die Van der Waals'schen Anziehungskräfte dem Abstand der durch sie verbundenen Moleküle umgekehrt proportional ist. Eine Abstandszunahme um nur 5 Å kann beispielsweise in besonderen Fällen eine Verringerung dieser Kräfte auf ein Hundertstel zur Folge haben.

Beim Abtöten und/oder Inaktivieren von Mikroorganismen tritt insofern ein Problem auf, als die zur Abtötung und/oder Inaktivierung bzw. Attenuierung führende Massnahme die übrigen Bestandteile des Produktes möglichst wenig beeinflussen soll. Je mehr die dielektrische Beeinflussung des Produktes erhöht wird, umso stärker ist diese Beeinflussung. Bei der Beseitigung obiger Schwierigkeit geht die vorliegende Erfindung von der Erkenntnis aus, dass, wenn die mittlere Dielektrizitätskonstante und/oder der dielektrische Verlustfaktor ( $\tan \delta$ ) des Produktes geringer sind als die der abzutötenden Mikroorganismen, der Temperaturanstieg der Hochfrequenzerwärmung in den Mikroorganismen wesentlich schneller erfolgt als in der diese enthaltenden Substanz oder in dem diese enthaltenden Produkt. Im umgekehrten Fall tritt die gleiche Wirkung ein, wenn die Mikroorganismen von ihrem Material oder von ihrer Struktur her schlechtere Wärmeleiter sind als ihre Umgebung und die aufgenommene (thermische) Energie nur viel langsamer abstrahlen können. Die aufgenommene Energie staut sich somit in ihnen auf. Ein solches Beispiel sind die Bakterien-Sporen. Dementsprechend ist die Erfindung dadurch gekennzeichnet, dass

die Erwärmung der Gesamtmasse des zu behandelnden Objekts auf eine mittlere Temperatur erfolgt, die geringfügig unter der Temperatur liegt, bei welcher die Eiweissbestandteile der abtötenden und/oder zu inaktivierenden Mikroorganismen gerinnen. Das Mass, um welches die mittlere Temperatur des Produktes unter der Eiweissgerinnungstemperatur der abzutötenden und/oder zu inaktivierenden Mikroorganismen (nachfolgend nur noch kurz Gerinnungstemperatur genannt) liegt, hängt von mehreren Faktoren ab. Zunächst einmal ist hier der Unterschied der mittleren Dielektrizitätskonstanten und/oder dem dielektrischen Verlustfaktor ( $\tan \delta$ ) von Produkten und Mikroorganismen wesentlich. Ist dieser Unterschied gross, so kann auch die Temperatur, auf welche erwärmt wird, tiefer unter der Gerinnungstemperatur liegen. Je geringer der Unterschied der Dielektrizitätskonstanten ist, umso näher muss die Temperatur, auf welche erwärmt wird, an der Gerinnungstemperatur liegen, es sei denn, dass die Verschiedenheit in der Wärmeleitfähigkeit im Mikroorganismus einen Wärmestau verursacht, wodurch Energie in der Hauptsache nur nach innen - zu den für den Mikroorganismus lebenswichtigen Aminosäuren und Nukleinsäuren - abfliessen kann. Ein weiterer wesentlicher Faktor ist die Energiedichte, mit welcher die Produkte bestrahlt werden. Je geringer die Energiedichte ist, umso höher muss auch die Temperatur liegen, auf welche erwärmt wird, da bei geringerer Energie-

dichte die in den Mikroorganismen erzeugte Wärme mehr Zeit hat, in das umgebende Produkt abzufließen. Je höher die Energiedichte ist, umso kürzer kann die Bestrahlungszeit gewählt werden und umso niedriger kann die Temperatur liegen, auf welche das Produkt erwärmt wird, denn die Gerinnung der Eiweiße erfolgt ja bekanntlich ohne Verzug, sobald die kritische Temperatur erreicht ist.

Wenn auch die Erfindung nicht hierauf beschränkt ist, so ist doch das Hauptanwendungsgebiet derselben die Abtötung und/oder Inaktivierung von Mikroorganismen in einem hohen Wasserbestandteil aufweisenden Produkten, wie z.B. Lebensmittelkonserven und Bakterienkulturen.

Die Erfindung hat eine außerordentliche Ausdehnungsbreite, da die meisten abzutötenden Mikroorganismen eine Umhüllung aus Wachs oder wasserlöslichen Substanzen besitzen, deren mittlere Dielektrizitätskonstante und/oder deren dielektrischer Verlustfaktor ( $\tan \delta$ ) relativ gross und deren Wärmeleitfähigkeit relativ gering ist. Dadurch entsteht in dieser Umhüllung eine erhöhte Temperatur, welche die Einwirkungsbedingung für Mikroorganismen im Inneren der Umhüllung bewirkt, wenn die mittlere Temperatur des umgebenden Produkts noch unter der Gerinnungstemperatur liegt. Anders: Mikroorganismen enthalten in ihrem Inneren

fetthaltige Substanzen (z.B. Liposaccharide), welche die im Kraftfeld aufgenommene Wärme länger speichern als ihre im wesentlichen aus Wasser bestehende Umgebung. In diesem Falle geht die thermische Wirkung des Verfahrens auf die zu schädigenden oder zu vernichtenden Proteine von diesem, in ihrer unmittelbaren Nähe befindlichen Material aus. Die Gerinnungstemperatur ist natürlich für die verschiedenen Mikroorganismen unterschiedlich. Sie liegt in der Regel zwischen 60 und 85°. Liposaccharide gerinnen z.B. erst bei ungefähr 82°C.

Die Erwärmung erfolgt vorteilhaft auf einen Wert, der über etwa dem Mittelwert zwischen 37°C und der Eiweissgerinnungstemperatur des Mikroorganismus liegt. Auf der anderen Seite wird es bevorzugt, dass die Erwärmung auf eine Temperatur erfolgt, die möglichst mehr als 3°C unter der Eiweissgerinnungstemperatur der abzutötenden Mikroorganismen liegt. Innerhalb dieser Grenzen wird man in den allermeisten Fällen auskommen, wenn auch Überschreitungen derselben in Sonderfällen nicht ausgeschlossen sind.

Vorteilhaft wird die Behandlung des Produktes und/oder Präparates, wenn besonders der Gehalt an Desoxyribonukleinsäure bzw. Ribonukleinsäure der Mikroorganismen durch die nichtthermischen Einwirkungen des elektromagnetischen



Kraftfeldes geschädigt werden soll, so ausgeführt, dass eine um etwa  $10^{\circ}\text{C}$  unter der Gerinnungstemperatur der Eiweissbestandteile der Mikroorganismen liegende mittlere Temperatur des Produktes und/oder Präparates nicht überschritten wird. Diese Behandlung ist besonders dann vorteilhaft, wenn eine Inaktivierung und/oder Attenuierung der Mikroorganismen erreicht werden soll.

Nachfolgend werden einige Beispiele der Erfindung beschrieben.

#### V e r s u c h 1

Eine in Rinderbouillon aufgehängte *Staphylococcus aureus* haemolyticus Kultur mit einer Keimzahl von 1 640 000. pro  $\text{cm}^3$  wurde bei Zimmertemperatur (etwa  $21^{\circ}\text{C}$ ) in eine luftdichte, aus einem Material mit niedrigem dielektrischem Verlustfaktor gefertigte und zuvor sterilisierte Umhüllung eingeschlossen und anschliessend während 120 Sekunden einem elektromagnetischen Kraftfeld mit einer Frequenz von 2450 MHz ausgesetzt.

Die Temperatur der Flüssigkeit stieg während der Behandlung mit dem elektromagnetischen Kraftfeld auf  $60^{\circ}\text{C}$ . an.

Anschliessend wurde das so behandelte Präparat während 48 Stunden in einem elektrisch betriebenen, automatischen Brutofen bei  $37^{\circ}\text{C}$  bebrütet.

Nach Ablauf dieser Zeit konnten keine Keime mehr festgestellt werden. Dieser negative Befund ergab sich auch bei späteren Nachuntersuchungen.

Es hat somit bei diesem Versuch, der knapp unter der Pasteurisierungstemperatur stattfand, die völlige Vernichtung der Kultur stattgefunden. Dieses Ergebnis ist besonders wegen der vergleichsweise sehr kurzen Erhitzungsdauer bemerkenswert; die Temperatur des Präparats - ebenso wie die der in den weiter unten beschriebenen Versuchen verwendeten - sank bei Aussetzen des Präparats der Zimmertemperatur von ca.  $21^{\circ}\text{C}$  sehr schnell von der Maximaltemperatur auf die Zimmertemperatur ab. Bis zum Eintritt in den Bruttofen verging jeweils eine gute Stunde. Mit den Präparaten in den weiter unten beschriebenen Versuchen wurde ebenso verfahren.

Es ist weiterhin zu bemerken, dass absichtlich eine Keimzahl gewählt worden war, wie sie in dieser Höhe in der Natur nicht vorkommt.

## V e r s u c h 2

Das bei diesem Versuch verwendete Ausgangspräparat glied in allen Einzelheiten demjenigen, welches in Versuch 1 verwendet wurde. Auch das Kraftfeld war das gleiche, nur die

Dauer der Behandlung wurde von 120 Sekunden auf 90 Sekunden herabgesetzt.

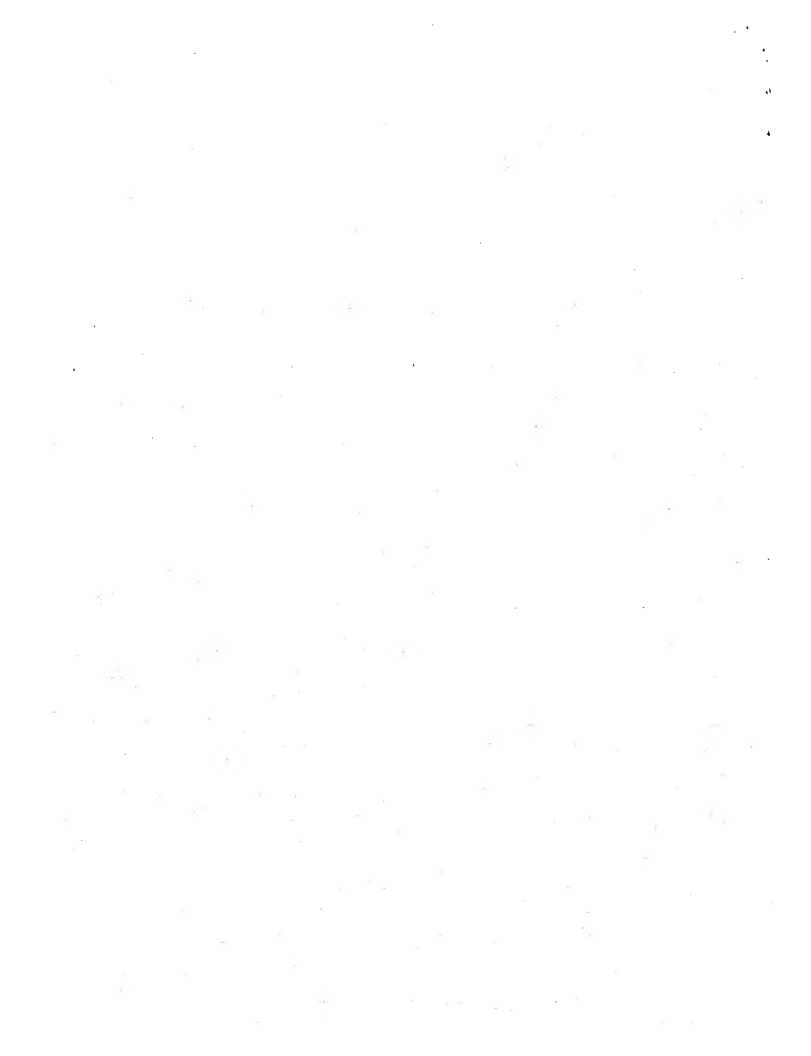
Die Temperatur der Flüssigkeit stieg während der Behandlung mit dem elektromagnetischen Kraftfeld auf 50°C an.

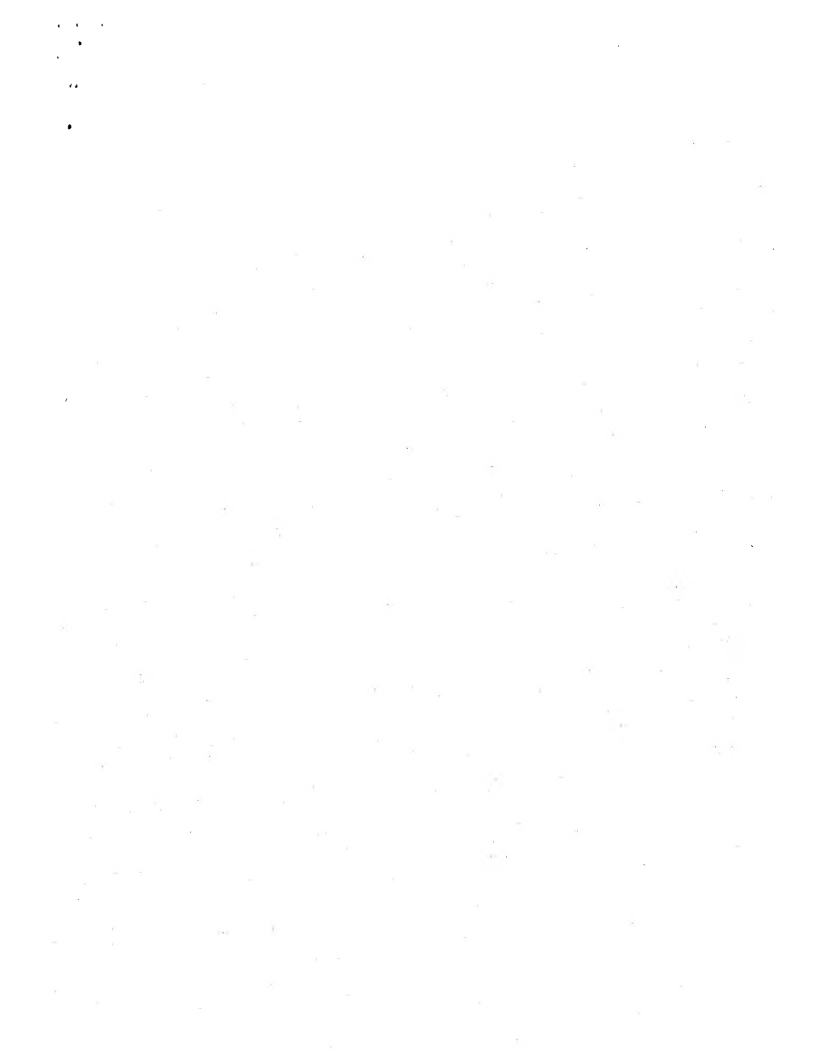
Nach 48 Stunden Bebrütung bei 437°C - wie oben beschrieben - wurden nur noch 45 000 pro cm<sup>3</sup> Staphylococcus aureus haemolyticus gefunden. Die Keimzahl war von 1.640.000 auf 45.000 also sehr wesentlich gesunken, obwohl die mittlere Temperatur des Präparats erheblich unter der Pasteurisierungstemperatur blieb.

Hierauf wurde das Präparat bei -20°C auf 21 Tage eingefroren, und anschliessend während 48 Stunden bei 437°C - wie oben beschrieben - bebrütet. Bei der Auszählung konnten nur noch 14 500 fortpflanzungsfähige Keime pro cm<sup>3</sup> festgestellt werden.

Die Toxizität und die haemolytischen Eigenschaften der noch fortpflanzungsfähigen Keime blieb unverändert.

Es ist bekannt, dass Bakterien durch Einfrieren in ihrer Fortpflanzungsfähigkeit gehemmt werden, doch ist diese Hemmung unverhältnismässig geringer (etwa 1%) als die hier 21 Tage nach der thermischen Behandlung gefundene Hemmung von 66%. Bei Viren ist eine solche Hemmung nicht vorhanden.





### V e r s u c h   3

Bei diesem Versuch und beim weiter unten angeführten Versuch 4 wurde ein anderes Grundpräparat verwendet. Es bestand aus einer in physiologischer Kochsalzlösung (0,8% NaCl) aufgehängten Kultur von Poxvirus vaccinia, wie sie - wenn auch nicht in dieser Konzentration - für die Pockenschutzimpfung verwendet wird, mit einer Keimzahl von 50.000.000 pro  $\text{cm}^3$ . Diese Kultur wurde mit Staphylococcus aureus-Bakterien solcherart infiziert, dass ausser den Viren auch noch 54 000 pro  $\text{cm}^3$  Staphylococci zu verzeichnen waren. Die Versuchsanordnung blieb die gleiche wie für den Versuch 1 beschrieben.

Bei diesem Versuch wurde das Präparat während 120 Sekunden dem Kraftfeld ausgesetzt. Die Temperatur der Flüssigkeit stieg während der Behandlung mit dem elektromagnetischen Kraftfeld auf 60°C. Auch dieses Präparat wurde während 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

Bei der darauffolgenden Untersuchung konnten weder Poxvirus vaccinia noch Staphylococcus aureus festgestellt werden. Dieses Ergebnis blieb auch bei späteren Nachuntersuchungen bestehen.

Somit wurden Bakterien wie Viren bei einer mittleren Temperatur des Präparats knapp unter der Pasteurisierungstemperatur vernichtet.

V e r s u c h   4

Das Grundpräparat und alle anderen Versuchsbedingungen einschliesslich Kraftfeld blieben bei diesem Versuch genau die gleichen wie bei Versuch 3, nur die Zeitdauer der elektrischen Behandlung wurde von 120 auf 90 Sekunden herabgesetzt.

Die Temperatur der Flüssigkeit stieg während der Behandlung mit dem elektromagnetischen Kraftfeld auf 50°C.

Anschliessend wurde das Präparat während 48 Stunden bei 37°C bebrütet.

Die Keimzahl für Staphylococcus aureus sank von 54 000 auf 12 Stück und die Keimzahl von Poxvirus vaccinia von 50 000 000 auf 50 Stück pro cm<sup>3</sup>. Dieser objektive Befund (Keimzahl) hat sich auch bei nach ~~mechanisch~~ nochmaligem Auftauen und Wiedereinfrieren durchgeführten Betritungen und Auszählungen nicht verändert.

Somit konnte festgestellt werden, dass bei einer mittleren Temperatur des Präparats, welche 10 bis 15°C unter der Pasteurisierungstemperatur (Gerinnungstemperatur) lag, die Keimzahl sowohl von Viren als auch von Bakterien bedeutend gesenkt und dass die Fortpflanzungsfähigkeit der Keime gehemmt worden war (Attenuierung).

Es wurde fernerhin erwiesen, dass Viren prozentual stärker in Mitleidenschaft gezogen wurden als Bakterien. Zumindest in der beschriebenen Versuchsanordnung zeigten sich die Viren empfindlicher, was die Abtötung der einen Art bei Erhaltung der anderen nahelegt, wenn die Kultur gemischter Art oder besser gesagt versucht ist.

Bei weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass Sporen auf diese Behandlung ähnlich wie Bakterien reagierten.

Ein mit frischer Leberwurst durchgeführter Versuch ergab Bakterienfreiheit nach 100 Sekunden bei einer Temperatur von etwa 62°C.

Aus den Ergebnissen der Versuche 1 bis 4 erhellt :

- a) dass die dielektrische Behandlung in den Mikroorganismen eine höhere Temperatur erzeugt als in deren wässrigen Umgebung und
- b) dass die Einwirkungen des Kraftfeldes - entweder durch elektromagnetische oder durch mechanische Kräfte, welche letztere Folgen der elektromagnetischen Kräfte sein müssen - eine durch die Erfindung beabsichtigte Wirkung auf die Mikroorganismen bzw. auf deren Komponenten ausüben.



Diesen Schluss lassen insbesondere die Ergebnisse der Versuche 2 und 4 wegen der bei diesen vorhandenen erheblichen Differenz zwischen der erreichten Temperatur und der Gerinnungstemperatur, sowie wegen fortschreitender Senkung der Keimsahl lange nach Beendigung der Erhitzung und die Hemmung der Fortpflanzungsfähigkeit trotz mehrfachen Auftauens zu.

Patentansprüche :

P a t e n t a n s p r ü c h e :

1. Verfahren zum Abtöten und/oder Inaktivieren und/oder Attenuieren von Mikroorganismen in Produkten und/oder Präparaten, deren mittlere Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon$ ) und/oder deren dielektrischer Verlustfaktor ( $\tan \delta$ ) oder deren Wärmeleitzahl von denen der abzutötenden oder zu schädigenden Mikroorganismen abweicht, mittels elektrischer, vorsugsweise dielektrischer Behandlung, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt bzw. das Präparat einem hochfrequenten elektromagnetischen Wechselfeld ausgesetzt wird, und dass diese Behandlung abgebrochen wird sobald die infolge der thermischen Wirkung des Kraftfeldes ansteigende mittlere Temperatur des Produktes bzw. des Präparates nahe aber noch unterhalb der Temperatur liegt, bei welcher die Eiweissbestandteile der abzutötenden und/oder zu inaktivierenden und/oder zu attenuierenden Mikroorganismen gerinnen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Erwärmung auf eine Temperatur erfolgt, die über etwa dem Mittelwert zwischen  $37^{\circ}\text{C}$  und der Eiweissgerinnungstemperatur der Mikroorganismen liegt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Erwärmung auf eine Temperatur erfolgt,

die mehr als  $3^{\circ}\text{C}$  unter der Eiweissgerinnungstemperatur der abzutötenden Mikroorganismen liegt.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Erwärmung durch kurzfristige Bestrahlung mit hoher Energiedichte bewirkt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Behandlung des Produktes und/oder Präparates im elektromagnetischen Kraftfeld, insbesondere bei der Inaktivierung und/oder Attenuierung von Mikroorganismen, eine um etwa  $10^{\circ}\text{C}$  unter der Gerinnungstemperatur der Eiweissbestandteile der Mikroorganismen liegende mittlere Temperatur des Produktes und/oder Präparates nicht überschritten wird.





[Display without Links](#) | [Return to Results](#)

## Display from WPINDEX

ANSWER 1 © 2006 THE THOMSON CORP on STN

### Title

Process for inactivation of microorganisms in - products or prepsn.

### Patent Assignee

(BAC-I) BACH J; (BACH-I) BACH J

### Patent Information

DE 1814084	A	(197026)*	<--
CH 552985	A	19740830 (197439)	
DE 1814084	B	19770616 (197725)	<--

### Priority Application Information

DE 1968-1812470      19681203; DE 1968-1814084      19681211

### Abstract

DE 1814084 A UPAB: 19930831

Process for inactivation of microorganisms in products or preparations consists of high frequency irradiation of short duration without excessive heating effects; the temp. rises above 37 degrees C to within 10 degrees of the degradation temp. of the microorganism protein content.

### Accession Number

1970-46318R [26] WPINDEX

[Full-Text Options](#)

[STN Keep & Share](#)

[Search the Web](#)

with



